

UniversitätsSpital Zürich
Klinik für Hämatologie
Klinikdirektor Prof. Dr. med. M.G. Manz

Arbeit unter Leitung von PD Dr. med. U. Schanz und PD Dr. med. G. Stüssi

Reduktion der Inzidenz von antierythrozytären Alloantikörpern durch die
Leukozytendepletion von Erythrozytenkonzentraten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Ruth Andrea Köppel
von Zürich

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. M.G. Manz
Zürich 2011

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
2. Einführung	4
3. Patienten und Methode	10
4. Resultate	16
5. Diskussion	29
6. Schlussfolgerung	32
7. Referenzen	33
8. Verdankung	41
9. Curriculum vitae	42

1. Zusammenfassung

Es gilt als gesichert, dass leukozytendepletierte Thrombozytenkonzentrate beim Empfänger zu einer verminderten Immunisierung gegen humane Leukozyten-Antigene (HLA-Antigene) führen und dass unerwünschte posttransfusionelle Nebenwirkungen, wie beispielsweise die nicht hämolytische, febrile Transfusionsreaktion (NHFT), weniger häufig auftreten. Hingegen ist die Bedeutung der Leukozytendepletion für die Entwicklung von antierythrozytären Antikörpern nicht geklärt. In der Schweiz wurde die generelle Leukozytendepletion 1999 eingeführt. In dieser retrospektiven Studie wurde in einem Kollektiv von 378'785 Antikörpersuchtests, die von 1973 bis 2006 am Universitätsspital Zürich durchgeführt wurden, das Auftreten von posttransfusionellen Alloantikörpern gegen die Blutgruppensysteme Rhesus, Kell, Duffy, Kidd, Lutheran, MNS, Lewis, P untersucht und die Häufigkeit von positiven Antikörpersuchtests vor und nach Einführung der Leukozytendepletion im Juli 1999 eruiert. Unsere Analyse ergab eine deutliche Reduktion der häufigen Antikörper gegen das Rhesus-, Kell- und Lewis-Blutgruppensystem ab Juli 1999. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass die Leukozytendepletion signifikant zur Reduktion der unerwünschten anti-erythrozytären Alloimmunisierung beiträgt.

2. Einführung

Ziel und Zweck der Arbeit

Allein im UniversitätsSpital Zürich erhalten jedes Jahr Tausende von Patienten eine Bluttransfusion (1). Die wichtigsten Transfusionen umfassen Erythrozyten, Thrombozyten und frisch gefrorenes Plasma (FFP). Keines dieser Blutprodukte konnte bisher durch alternative Methoden ersetzt werden und das Funktionieren eines Spitals ist bis heute von einer optimalen Blutversorgung abhängig. Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung einer Transfusion ist, dass die verabreichten Blutprodukte zwischen Spender und Empfänger kompatibel und möglichst frei von Krankheitserregern sind. Eine Massnahme zur erhöhten Sicherheit von Transfusionen stellt die Einführung der generellen Leukozytendepletion dar, welche im Juli 1999 in der gesamten Schweiz eingeführt wurde. Darunter versteht man die Reduktion von Leukozyten aus Blutprodukten. Es wurde eine maximale Anzahl von Leukozyten definiert, die nach der Leukozytenfiltration noch in den Blutprodukten vorhanden sein durften. In dieser retrospektiven Analyse positiv ausgefallener Antikörpersuchtests am UniversitätsSpital Zürich zwischen 1973 und 2006 wurde die Frage untersucht, inwiefern sich die Einführung der Leukozytendepletion im Jahre 1999 auf das Auftreten irregulärer antierythrozytärer Antikörper ausgewirkt hat; eine Frage, die aktuell kontrovers diskutiert wird.

Antierthrozytäre Alloimmunisierung

Wird eine Person durch Bluttransfusionen, Schwangerschaft, Gewebe- oder Organtransplantation fremden Blutgruppenantigenen (= Oberflächenmoleküle auf Erythrozyten, welche entweder aus Zuckerstrukturen oder (ggf. glykosylierten) Proteinen bestehen ausgesetzt, so kann dies zu einer Immunisierung und dadurch zu einer Produktion von Antikörpern gegen diese Moleküle führen, sogenannte Alloantikörper. Auf humanen Erythrozyten gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Blutgruppensystemen. Insgesamt sind bis heute 30 Blutgruppensysteme bekannt. Die meisten Blutgruppensysteme bestehen aus mehreren verschiedenen Blutgruppenantigenen, so dass aktuell ca. 300 Blutgruppenantigene bekannt sind (2). Die transfusionsmedizinisch wichtigsten Blutgruppensysteme stellen das ABO-, Rhesus-, Kell-, Duffy-, Kidd-, Lewis-, MNS-, und das Lutheran System dar (Tabelle 1).

Kohlenhydrate		Proteine	
Blutgruppe	Antigene	Blutgruppe	Antigene
ABO	A, B, H	Rh	C,c,D,E,e
Lewis	Le ^a , Le ^b	Kell	K,k
		Duffy	Fy ^a , Fy ^b
		Kidd	Jk ^a , Jk ^b
		MNS	M, N,S,s

Tabelle 1. *Biochemie wichtiger Blutgruppensysteme und -antigene mit Unterteilung in Kohlenhydrate und Proteine.*

Bei den gegen das ABO System gerichteten Antikörpern handelt es sich um sogenannte natürliche Antikörper. Darunter versteht man präformierte Antikörper, die unabhängig von einer vorgängigen Immunisierung

mit Blutprodukten zirkulieren. Die Antikörper entstehen meist schon kurz nach der Geburt durch Kontakt mit Darmbakterien, welche ABO Antigene auf ihrer Oberfläche besitzen und somit Antikörperreaktionen hervorrufen können. Im Gegensatz dazu sind die Antikörper der meisten anderen Blutgruppensysteme irregulär, d.h. sie entstehen erst durch direkten Kontakt mit körperfremden erythrozytären Antigenen im Rahmen einer Bluttransfusion oder einer Schwangerschaft. Die Fähigkeit eines solchen Antigens, eine Alloimmunisierung auszulösen, sprich, seine Immunogenität, ist je nach Antigen unterschiedlich stark ausgeprägt. So führt die Übertragung einer D-positiven Blutkonserve in ca. 80% zur Bildung von Anti D Antikörpern (3, 4, 5). Die Immunogenität vieler anderer erythrozytärer Antigene ist deutlich geringer (6).

Neben der Immunogenität der Antigene spielen angeborene oder erworbene Patienteneigenschaften, sowie die Sensitivität der verschiedenen Antikörpersuchtests (AKS) eine wichtige Rolle im Nachweis posttransfusionell gebildeter Alloantikörper. Klinische Risikofaktoren für eine Alloimmunisierung sind weibliches Geschlecht, solide Tumoren, Diabetes mellitus sowie Status nach Stammzell-Transplantation (7). Weiter scheint auch die Immunitätslage des Empfängers eine Rolle zu spielen. Ein supprimiertes Immunsystem führt möglicherweise zu einer verminderten Immunantwort, wo hingegen ein kompetentes oder hochreguliertes Immunsystem, z.B. durch eine vorhandene Entzündung, zu einem erhöhten Titer von Alloantikörpern führen kann (8, 9). Eine Studie untersuchte bereits alloimmunisierte Patienten, sogenannte „responders“, welche erneut

Transfusionen erhielten. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit bereits vorhandenen Alloantikörpern ein 20fach erhöhtes Risiko für eine weitere Alloimmunisierung im Vergleich zum „first time Alloimmunisierungsrisiko“ bestand. Im Gegensatz dazu tendierten Patienten, die bereits bei der ersten Transfusion keine Alloantikörper entwickelt hatten (sog. non-responder“), auch bei erneuter Transfusion nicht zu einer Alloimmunisierung (10).

Retrospektive Studien in der Bevölkerung haben gezeigt, dass die Häufigkeit irregulärer Antikörper nach Transfusion zwischen 1-3% beträgt (11,12). Bei Patienten mit wiederholten Transfusionen beträgt diese Zahl jedoch bis rund 70% (13, 14, 15, 16). Die Häufigkeit der einzelnen Antikörper nach Transfusion variiert stark. Eine Untersuchung positiver AKS in Olmsted County, einer nordamerikanischen Stadt mit einem Anteil von 96% Personen europäischen Ursprungs, ergab folgende Zahlen (passiv erworbene Anti D Antikörper wurden nicht mitgezählt): Anti E (20.8%), Anti Le^a (18.6%) Anti K(14.7%), Anti D (12.9%), Anti Le^b (9.4%), Anti M (7.2%), Anti P (6.7%), Anti Fy^a (6.3%), Anti C (6.8%), Anti c (3.5%) (17). Andere Studien, welche ebenfalls die Inzidenz der einzelnen Antikörper untersuchten, kamen zu ähnlichen Resultaten (11, 18).

Das zeitliche Auftreten von Alloantikörpern nach Transfusionen kann sehr variabel sein. So überschreiten einige Antikörper bereits nach 3 Tagen, andere erst nach 5 Jahren die Nachweisgrenze (19). In einer Studie über die Persistenz von Alloantikörpern 20 Jahre nach positivem AKS, konnten rund 25% aller Antikörper nicht mehr nachgewiesen werden (20). Da weitere AKS nach Transfusionen nicht routinemässig durchgeführt werden, spielen diese Befunde insofern eine Rolle, als dass bei einer erneuten Transfusion das Risiko einer verzögerten hämolytischen Reaktion besteht. Deshalb ist ein neuer AKS vor jeder späteren Transfusion unbedingt notwendig.

Leukozytendepletion

In vielen westlichen Ländern wurde in den letzten zehn Jahren die Leukozytendepletion, also die Entfernung von Leukozyten aus den Blutprodukten eingeführt. Beweggrund dafür war die Erkenntnis, dass Leukozyten eine wichtige Rolle in der Übertragung von Pathogenen (beispielsweise dem Protein für die Creutzfeldt Jakob Krankheit) und in der Entwicklung gefährlicher Immunreaktionen

spielen. Ursprünglich wurden multiple Methoden zur Herstellung von leukozyten-armem Blut entwickelt. Es lassen sich fünf Standardmethoden unterscheiden: 1) Zentrifugation 2) Sedimentation, 3) Waschen der Zellen, 4) Gefrieren und Auftauen und 5) Filtration (21). Aufgrund ihrer einfachen Handhabung sowie ihrer Effizienz hat sich heute die Filtration als Methode der Wahl durchgesetzt. Die am UniversitätsSpital Zürich verwendeten Blutprodukte werden wie in der gesamten Schweiz, seit Juli 1999 *alle* mittels Filtration leukozytendepletiert (sog. universelle Leukozytendepletion). Vor der Ära der Leukozytendepletion wurde die Leukozytenanzahl in Erythrozytenkonzentraten bereits durch die Entfernung des buffy coats auf $< 1 \times 10^9$ Leukozyten/Einheit reduziert (22). Durch die Leukozytendepletion erzielt man sehr viel tiefere Werte. Die aus Mikroaggregaten aufgebauten Filter entfernen 99% der Leukozyten aus den Blutprodukten (23, 24). Damit lässt sich die Anzahl Leukozyten in Blutprodukten auf $< 1 \times 10^6$ Leukozyten/Einheit reduzieren, was dem derzeit geltenden europäischen Standard entspricht (23).

Theoretische Mechanismen der Leukozytendepletion

Neben der gefürchteten Übertragung von Pathogenen kann eine Kontamination von Blutprodukten mit Leukozyten zu Antikörperbildung nach Transfusion von Blutprodukten führen, indem Spenderleukozyten nach Kontakt mit Empfängerantigenen aktivierende und co-stimulierende Moleküle exprimieren. Leukozytenreduktion sollte demnach zu einer verminderten Antikörperbildung beitragen. Wie unten genauer beschrieben, konnte dieser Effekt bei der Entstehung von HLA Antikörpern bereits nachgewiesen werden (25). Da es sich bei Leukozyten auch um antigen-präsentierende Zellen handelt, wird durch Leukozytendepletion die direkte Kaskade der Alloimmunisierung durch T- Zell Interaktion von Spender- und Empfängerzellen aufgehoben. Ausserdem konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass allogene Bluttransfusionen zu einer Down Regulation der Typ-1-Immunantwort zu Gunsten der Typ-2-Immunantwort führen, was womöglich die Entstehung von Alloantikörpern fördert (26, 27). Die Typ-1-Immunantworten beinhalten die Produktion von γ - Interferonen, IL-12 und weiterer Zytokine und führen unter anderem zur Hypersensibilisierung vom Spät-Typ, während die Typ-2-Immunantworten IL-4, IL-5 und IL-10 sowie humorale Immunantworten mit IgG, IgA und IgE involvieren. Die Down Regulation der Typ-1- Immunantwort zu Gunsten der

Typ-2-Antwort könnte mitverantwortlich sein für die Entstehung von Antikörpern gegen Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Plasmaproteine sowie weiteren unerwünschte Nebenwirkungen (28). In multiplen Studien wurde belegt, dass Empfänger bezüglich posttransfusioneller unerwünschter Nebenwirkungen signifikant von der Leukozytendepletion profitieren können. Die Leukozytendepletion führt gesichert zu:

- Einer Reduktion der HLA Alloimmunisierung nach Thrombozytentransfusionen (12, 25, 29, 30). Darunter versteht man die Bildung von Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenstrukturen (HLA) von Zellen des Spenders. Die Funktion der „human leucocyte antigens“ (HLA) oder auch MHC (major histocompatibility complex) Moleküle genannt, besteht darin, körpereigenen T-Lymphozyten körperfremde Peptide zu präsentieren, wodurch Antikörper gegen diese Peptid-MHC Komplexe gebildet werden oder aber die präsentierende Zelle direkt zerstört wird. Der Schwellenwert einer HLA Alloimmunisierung wird bei 5×10^6 transfundierten Leukozyten vermutet (31). Bei Patienten, welche auf wiederholte Thrombozytentransfusionen angewiesen sind, kann HLA Alloimmunisierung gegen HLA Klasse I Antigene infolge leukozytenkontaminierter Thrombozyten- oder Erythrozytenkonzentrate zu einem Antikörper vermittelten Transfusionsrefraktärzustand führen (32).
- Einer signifikanten Reduktion der Rate an febrilen, nicht hämolytischen Transfusionsreaktionen (FNHTRs), d.h. einer posttransfusionellen Temperaturerhöhung um 1°C , mit oder ohne Schüttelfrost, nach Ausschluss anderer Ursachen (33, 34, 35, 36, 37). FNHTRs sind harmlos und reagieren gut auf Antipyretika, trotzdem ist der Kostenaufwand gross, weil Infektionen ausgeschlossen werden müssen.
- Einer Reduktion der Übertragung einzelner pathogener Viren. Leukozyten sind in der Transmission, Reaktivierung und Dissemination von viralen Infektionen involviert. Unter den Viren, welche ausschliesslich via Leukozyten übertragen werden (HTLV1/2, EBV, CMV), stellt CMV das klinisch signifikanteste Virus bei bestimmten transfusionsabhängigen Patienten, wie beispielsweise immuninkompetenten Patienten nach Chemotherapien oder Stammzelltransplantation, bei Patienten nach

Organtransplantation oder bei Frühgeborenen dar. Multiple Studien kamen zum Schluss, dass Leukozytenfiltration eine effiziente Methode zur Prävention der CMV Transmission darstellt. (38, 39, 40).

Führt möglicherweise zu:

- Einer Reduktion postoperativer Infektionen. Es gibt Hinweise dafür, dass nach intraoperativer Gabe von homologem Blut vermehrt postoperative Infekte auftreten (41, 42). Ob die Leukozyten dafür verantwortlich sind und entsprechend Leukozytendepletion das Risiko postoperativer Infektionen senkt, wird weiterhin diskutiert (43, 44, 45, 46).
- Einer Reduktion der Übertragung von Krankheitserregern wie Bakterien (z.B. Yersinia) (47, 48).

Studien bezüglich des Einflusses der Leukozytendepletion auf die antierythrozytäre Alloimmunisierung zeigen kontroverse Resultate. In der vorliegenden Dissertation wurde diese Frage analysiert und die Inzidenz von posttransfusionell aufgetretenen antierythrozytären Antikörpern vor und nach Einführung der Leukozytendepletion im Jahre 1999 am UniversitätsSpital Zürich untersucht.

3. Patienten und Methode

Die Blutbank des UniversitätsSpitals Zürich (USZ) ist eine zentrale Blutauslieferung für alle Kliniken und Institute. Gleichzeitig werden in der Blutbank alle immunhämatologischen Untersuchungen des USZ durchgeführt. Die vorliegende Dissertation untersucht die Inzidenz von Alloantikörpern gegen Blutgruppenantigene am UniversitätsSpital Zürich in den letzten 33 Jahren (1973-2006). Die Studie wurde durch die kantonale Ethikkommission Zürich (KEZ) bewilligt. Im Rahmen der Dissertation wurden die Resultate aller positiven Antikörpersuchtests erfasst und mit der Gesamtzahl der durchgeführten Untersuchungen korreliert. Die Dissertation beschreibt die Verteilung der Antikörper und legt einen speziellen Fokus auf die Auswirkung der Einführung der generellen Leukozytendepletion. Die klinischen Indikationen für die Antikörper Screenings oder Informationen über vorgängige Transfusionen oder Schwangerschaften der einzelnen Patienten und die Anzahl der Transfusionen vor dem Antikörpersuchtest waren nicht verfügbar.

AM USZ sind die Hauptverbraucher von Erythrozytenkonzentraten die Intensivstationen, die chirurgischen und die hämato-onkologischen Abteilungen. Vor der Auslieferung von Erythrozytenkonzentraten muss bei jedem Patienten eine Blutgruppenbestimmung und die Verträglichkeit zwischen dem Patientenblut und dem Erythrozytenkonzentrat sichergestellt werden. Bei allen Patienten wird ein Antikörpersuchtest (AKS) durchgeführt.

Antikörper

Die Studie erfasste alle klinisch signifikanten Alloantikörper gegen die Rhesus-, Duffy-, Kell-, Kidd-, Lewis-, P-, MNSs -, sowie das Lutheran Blutgruppensysteme (s. Tabelle 2).

Rhesus	Kell	Duffy	Kidd	Lewis	P	MNS	Lutheran
Anti D	Anti K	Anti Fy ^a	Anti JK ^a	Anti Le ^a	Anti P ₁	Anti M	Anti Lu ^a
Anti C	Anti k	Anti Fy ^b	Anti JK ^b	Anti Le ^b		Anti N	Anti Lu ^b
Anti E	Anti Kp ^a					Anti S	
Anti c	Anti Kp ^b					Anti s	
Anti e	Anti Js ^a						
Anti C ^w	Anti Js ^b						

Tabelle 2. Alle in der Studie erfassten klinisch relevanten Antikörper.

Die nachgewiesenen Antikörper jedes Tests sowie der Patientennamen, Geburtsdatum, Geschlecht, und ABO Blutgruppe wurden in eine Excel-Liste eingetragen. Wenn ein Patient mehrmals auf Antikörper getestet wurde, wurde jeder Test eingetragen. Zusätzlich wurden, wenn verfügbar, passiv erhaltene Alloantikörper, d.h. prophylaktische Gabe von Anti D, erfasst. Wir formulierten keine spezifischen Ein- bzw. Ausschlusskriterien für die Patienten mit positivem AKS.

Antikörpersuchtest (AKS)

Je nach serologischem Verhalten können komplette und inkomplette Antikörper unterschieden werden. Erstere führen bei einer Inkubation mit entsprechenden Erythrozyten ohne weitere Massnahmen zu sichtbaren Verklumpungen der Erythrozyten (Hämagglutination) und können mit einem Agglutinationstest einfach nachgewiesen werden. Wichtigste Vertreter kompletter Antikörper sind gegen das ABO System gerichtete Anti A und Anti B. Inkomplette Antikörper hingegen (wichtigste Vertreter sind Antikörper gegen das Rhesus-, Kell-, Duffy-, Kidd-, Lewis-, MNS-, Lutheran System) bewirken trotz Bindung an Erythrozyten keine sichtbare Agglutination, weshalb zu ihrem Nachweis weitere Tests notwendig sind (s.u.) (49).

1. Agglutinationstest zum Nachweis kompletter Antikörper

Liegen spezifische Antikörper vor, binden sie Erythrozyten mit korrespondierendem Antigen und führen somit zu einer Agglutination. Der Test kann in einem Röhrchen (Tube), auf einem Objektträger oder in Platten durchgeführt werden. Dabei wird dem zu untersuchenden Serum eine Erythrozytensuspension beigemischt. Je nach Antikörpereigenschaft (Avidität und Titer) kann die Agglutination sofort (z.B. Anti A, Anti B) oder erst nach einer gewissen Zeit abgelesen werden.

2. Antiglobulintest (Coombs- Test) zum Nachweis inkompletter Antikörper

Hierbei nimmt man Anti- Humanimmunoglobulin (AHG), auch Coombs- Serum genannt, zu Hilfe. Als Coombs- Serum verwendet man zB. polyspezifische AHG oder einzelne monospezifische Antikörper gegen humanes IgG, IgM, IgA oder C3d. Der Coombs- Test spielt in der Blutgruppenserologie eine grosse Rolle. Man unterscheidet:

2.1 Direkter Coombs- Test

Der direkte Coombs- Test dient dem Nachweis inkompletter Antikörper, die *in vivo* an Erythrozyten **gebunden** sind (d.h die Erythrozyten sind *in vivo* sensibilisiert). Die Erythrozytensuspension wird 3-4mal mit dem 10fachen Volumen einer geeigneten Lösung gewaschen und direkt mit AHG inkubiert. Falls membran-gebundene Antikörper vorhanden sind, kommt es zu einer Agglutination nach der Inkubation (s. Abbildung 1).

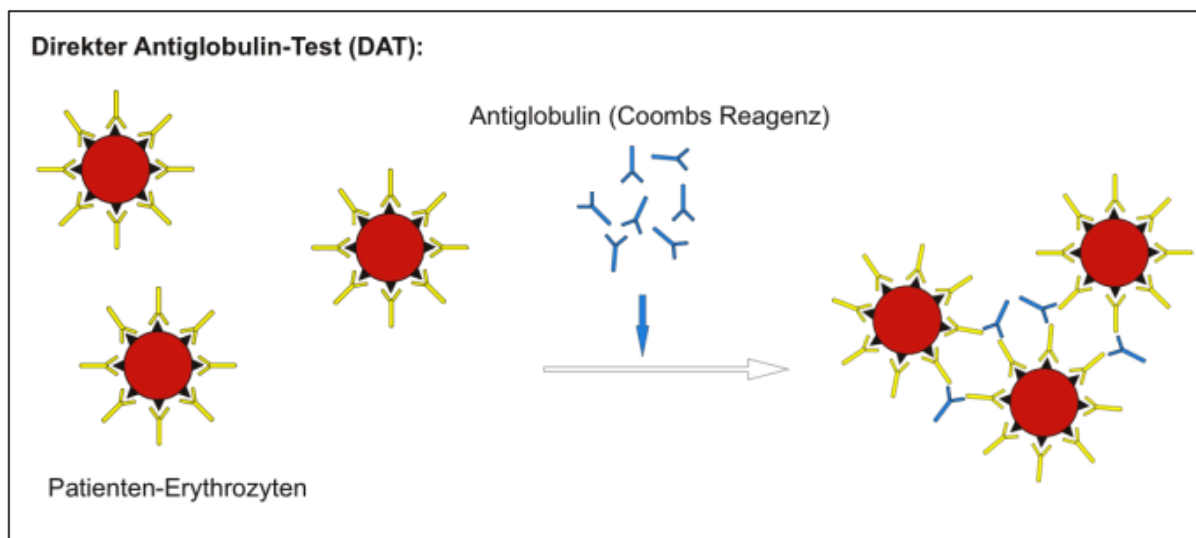


Abbildung 1. Direkter Coombs Test (50). Die Patienten- Erythrozyten werden direkt mit dem Coombs- Reagenz inkubiert wobei es bim Vorhandensein von membran- gebundenen Antikörpern zu Agglutination kommt.

2.2 Indirekter Coombs- Test

Der indirekte Coombs- Test weist **nicht- gebundene**, im Patientenserum zirkulierende inkomplette Antikörper nach, was eine *in vitro* Sensibilisierung notwendig macht. Dafür werden die Testerythrozyten zunächst mit dem zu untersuchendem Material (z.B. Serum, Eluat, u.a.) inkubiert. Falls gegen die

erythrozytären Antigene Antikörper der Klasse IgM im Serum vorhanden sind, agglutiniert der Ansatz bereits in diesem Schritt des Tests und das Testergebnis ist daher positiv. Verläuft der Test bis hierhin negativ, was meist der Fall ist, können noch vorhandene inkomplette Antikörper der Klasse IgG indirekt nachgewiesen werden: es wird zusätzlich Coombs- Serum (AHG) dazugegeben. Auch hier bedeutet eine Agglutination ein positives Testergebnis (s. Abbildung 2).

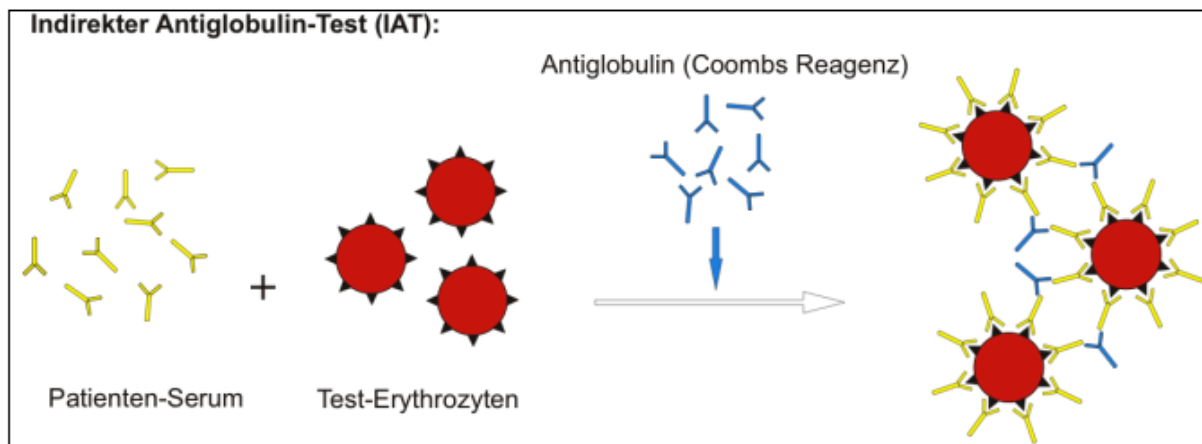


Abbildung 2. Indirekter Coombs- Test (50). Dabei werden im Patienten- Serum zirkulierende Antikörper nachgewiesen, indem das Serum zuerst mit Test-Erythrozyten inkubiert wird. Die nachzuweisenden Antikörper binden Erythrozyten mit passenden Antigenen und können nach Zugabe des Coombs- Reagenz durch Agglutination nachgewiesen werden.

3. Enzymtest

Durch proteolytische Behandlung (Fermentierung) von Erythrozyten können bestimmte erythrozytäre Antigene demaskiert oder für Antikörper besser zugänglich gemacht werden. Dadurch kann die Intensität der Reaktion von bestimmten Alloantikörpern im Coombs- Test verstärkt werden (z.B. bei Anti E). In anderen Fällen können durch proteolytische Behandlung der Erythrozyten die Antigene teilweise oder ganz zerstört werden, so dass die Reaktion mit spezifischen Antikörpern abgeschwächt oder ganz aufgehoben ist (z.B. Anti Duffy, Anti MNSs). Enzymtests werden analog dem normalen Coombs- Test durchgeführt. Im Unterschied dazu werden hier aber enzymatisch vorbehandelte Zellen (Papain, Trypsin, Ficin), verwendet oder das Enzym (Bromelin) wird zu unbehandelten Erythrozyten dazugegeben (49).

Antikörperidentifikation

Fällt ein Antikörpersuchtest positiv aus, so ist eine Antikörperspezifizierung erforderlich. Dabei wird das Serum gegen eine grössere Anzahl von Testzellen (sog. Panelzellen), die alle wesentlichen Erythrozytenantigene in bekannter Verteilung erhalten, getestet (s. Abbildung 3). Die Spezifität der im Serum enthaltenen Antikörper lässt sich durch Vergleich des Reaktionsmusters mit dem Vorkommen bestimmter Merkmale ermitteln.

	Rh-hr	Donor	Rh-hr						Kell						Duffy		Kidd		Lewis		P MN				Luth.		Serum Reaktion	
			D	C	E	c	e	C ^W	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	M	N	S	s	Lu ^a		Lu ^b
1	C ^W CD.ee	R ₁ ^W R ₁	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	++++
2	CCD.ee	R ₁ R ₁	+	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	++++
3	ccD.EE	R ₂ R ₂	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	++++
4	Ccddee	r'r	0	+		+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	-	
5	ccddEe	r''r	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	-	
6	ccddeE	rr	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	-	
7	ccddeE	Rr	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	-	
8	ccD.ee	R ₀ r	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	++++	
9	ccddeE	rr	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	0	+	-	
10	ccddeE	rr	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	-	
11	ccddeE	rr	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	-	

Abbildung 3. Beispiel einer Antikörperidentifikation. Die verschiedenen Spenderzellen sind in den Zeilen 1-11 aufgeführt. Unter Reaktion erkennt man wo eine Agglutination stattfand. In diesem Beispiel reagierten immer die Testzellen die über das Rhesus D Antigen verfügten. Folglich enthält das Patientenserum Anti D Antikörper.

Im UniversitätsSpital Zürich wurden im Zeitraum von 1973-1978 Antikörper mit einem Panel- Antikörperscreening im Röhrchentest erfasst. Bei positiven Tests wurden die Antikörper mit weiteren Panelzellen im Blutspendedienst Zürich genauer identifiziert. 1978 führte man auch die Antikörperidentifikation am USZ ein. Im Verlauf der 90er Jahre wurde der Röhrchentest immer mehr durch den ID Test von *DiaMed* (*DiaMed GmbH, Cressier, Schweiz*) verdrängt und nur noch bei unklarem Resultat eingesetzt. Antikörpersuchtests der gesamten Gynäkologie und Geburtshilfe wurden bis 1990 in einem eigenen Labor durchgeführt. 1991 übernahm diese Aufgabe das Hauptlabor des Spitals, initial jedoch nur für ein Jahr. Erst zwei Jahre später, nämlich 1993 wurde die AKS Infrastruktur der Frauenklinik definitiv aufgegeben und durch das Hauptlabor vollständig übernommen. Uns liegen nur jene Resultate vor, welche in

diesem Hauptlabor ermittelt wurden. 1999 wurde der erste Blutgruppenautomat eingeführt. Bei allen Schwangeren der Frauenklinik wurde damit die Blutgruppe bestimmt und ein AKS durchgeführt. Bei den restlichen Patienten verwendete man weiterhin den ID Test und führte nur bei gegebener Indikation oder Aufforderung ein AKS durch.

Leukozytendepletion

Die Depletion von Erythrozytenkonzentraten am UniversitätsSpital erfolgt mittels einem Blutverarbeitungsprozess, bei dem die Leukozyten aus dem Blutprodukt filtriert und somit deutlich reduziert werden. Der Filter besteht aus multiplen Schichten von Polyesterfasern, welche Leukozyten selektiv zurückhalten, während Erythrozyten und/oder Thrombozyten ungehindert durchfließen können. Der Filtration liegen drei Mechanismen zu Grunde (49):

- der mechanische Siebeffekt
- die direkte Adhäsion der Leukozyten an die Filterfasern
- die Adhäsion von Leukozyten an Thrombozyten die ihrerseits an Fasern adhärirt haben

Die Leukozytenfilter können bei der Verarbeitung zu 3 verschiedenen Zeitpunkten eingesetzt werden: 1) kurz nach Blutentnahme (*prestorage*, also vor der Lagerung), 2) nach variablen Perioden der Lagerung im Labor, oder 3) *at bedside*, sprich am Bett des Patienten während der Transfusion, was aber eine Qualitätskontrolle der leukozytenreduzierten Komponenten verunmöglicht. Mit den heute verwendeten Filtern kann die Leukozytenzahl um rund 99% reduziert werden (23, 24).

Statistische Methode

Die Daten wurden als Mittelwerte, Mediane oder Prozentzahlen dargestellt. Kontinuierliche Variablen wurden mittels Mann-Whitney-U oder Kruskal-Wallis und diskrete Variablen mittels Chi-Quadrat-Test verglichen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS Version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois USA).

4. Resultate

Baseline Charakteristika

Im untersuchten Zeitraum von 1973 bis 2006 wurden insgesamt 378'785 Antikörpersuchtests (AKS) durchgeführt. Davon waren 5602 positiv (1.4%), was im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Antikörper-Inzidenz von 1-2 % liegt (17, 51, 52, 53). Bei 4318 (77%) wurde nur ein positiver AKS gefunden, während 1284 (23%) Patienten mehrere positive Untersuchungen aufwiesen. Bei Patienten mit mehreren positiven Resultaten lagen im Median 2 (1-22) positive Tests vor.

1. Alters- und Geschlechtsverteilung

Das mediane Alter aller Patienten mit positiven AKS lag bei 39 Jahren (range 0-100), der Mittelwert betrug 45.02 Jahre. Die Altersverteilung war zweigipflig mit einem ersten Gipfel zwischen 20-40 Jahren. Dieser Gipfel ist vor allem durch AKS bei Frauen mit Rhesus inkompatiblen Schwangerschaften zu erklären. Dementsprechend lag auch der Anteil von Frauen mit positiven AKS während dieser Altersperiode im Vergleich zu allen anderen Altersgruppen signifikant höher (86% vs 58%, $p < 0.001$). Ein zweiter Gipfel findet sich zwischen 50 und 70 Jahren, bei diesem Gipfel ist die Verteilung zwischen Männern und Frauen weniger stark zu Gunsten der Frauen (s. Abbildung 4).

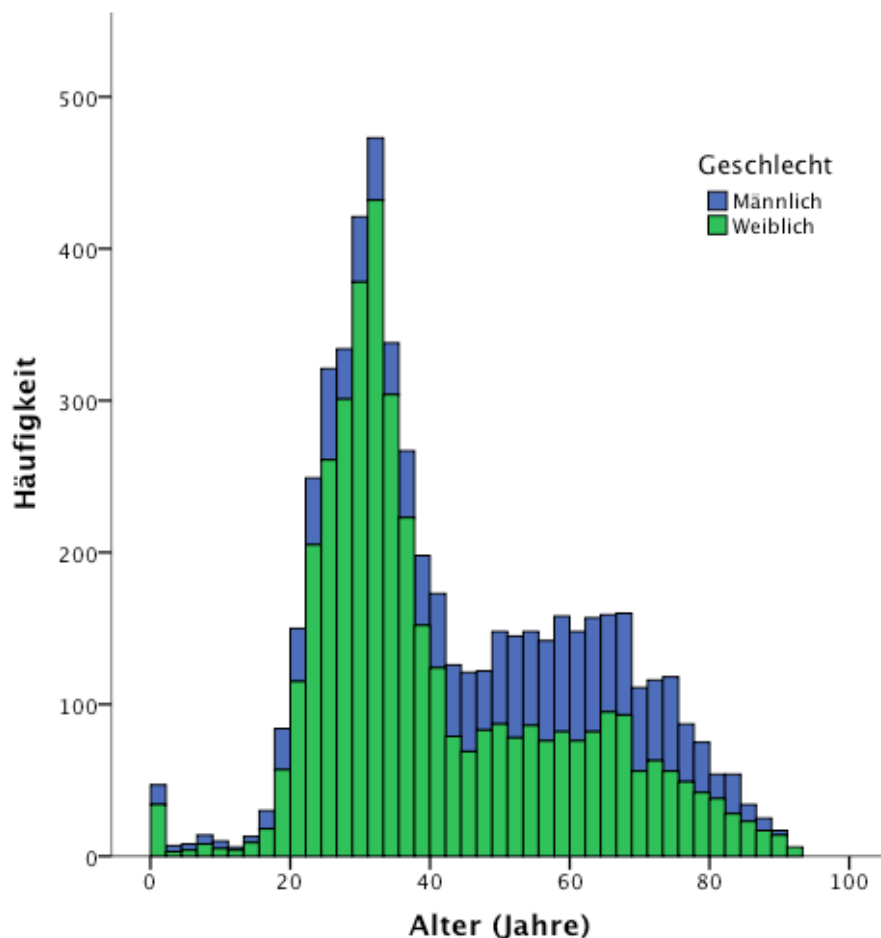


Abbildung 4. Häufigkeit der AKS in Abhängigkeit des Alters und Geschlechts der Patienten. Es finden sich zwei Gipfel, der erste zwischen 20-40 Jahren, welcher sich vor allem durch positive AKS bei Frauen mit Rhesus inkompatiblen Schwangerschaften erklären lässt, der zweite Gipfel zwischen 50 und 70 Jahren, hier weniger zu Gunsten der Frauen.

2. Durchgeführte Tests über die Zeit

Die Anzahl pro Jahr durchgeführter Tests scheint von den Jahren 1973 bis 1992 mehr oder weniger konstant anzusteigen. Im Jahre 1993 zeigt sich ein plötzlicher Abfall der durchgeführten Tests um mehrere Tausend. Dieser Trend lässt sich über die nächsten 5 Jahre bis und mit 1998 weiterverfolgen, bevor die Zahl der AKS im Jahr 1999 wieder deutlich ansteigt (s. Abbildung 5) Vergleicht man diesen Befund mit der Anzahl der pro Jahr durchgeführten Transfusionen von Blutprodukten (1983 bis 2006) am UniversitätsSpital Zürich, so zeichnet sich ein paralleler Verlauf im Bereich der Anzahl pro Jahr durchgeführten Erythrozyten- Transfusionen ab. Die Tiefstwerte liegen hier in den Jahren 1996-1998 (s. Abbildung 6). Die Ursache für diese Entwicklung lässt sich nicht klar eruieren. Sie könnte jedoch in Zusammenhang mit

den in dieser Zeit öffentlich geäußerten Bedenken bezüglich Transfusions-assoziiierter HIV Infektionen stehen, worauf in den USA und Europa in den 90er Jahren restriktivere Transfusionsbedingungen durchgesetzt wurden (54), welche im Verlauf durch bessere diagnostische Methoden wieder relativiert wurden.

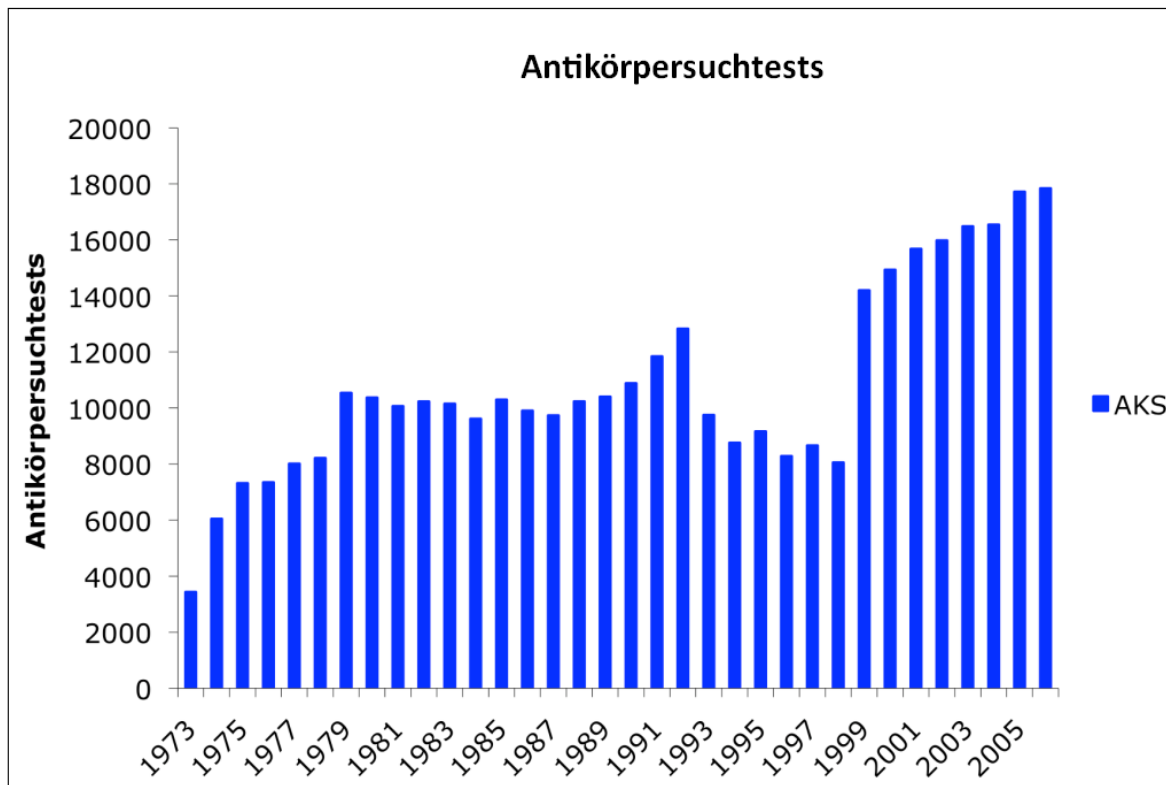


Abbildung 5. Anzahl durchgeführte Tests pro Jahr zwischen 1973 2005. Im Jahre 1993 beobachtet man einen plötzlichen Abfall, welcher bis im Jahre 1998 persistiert.

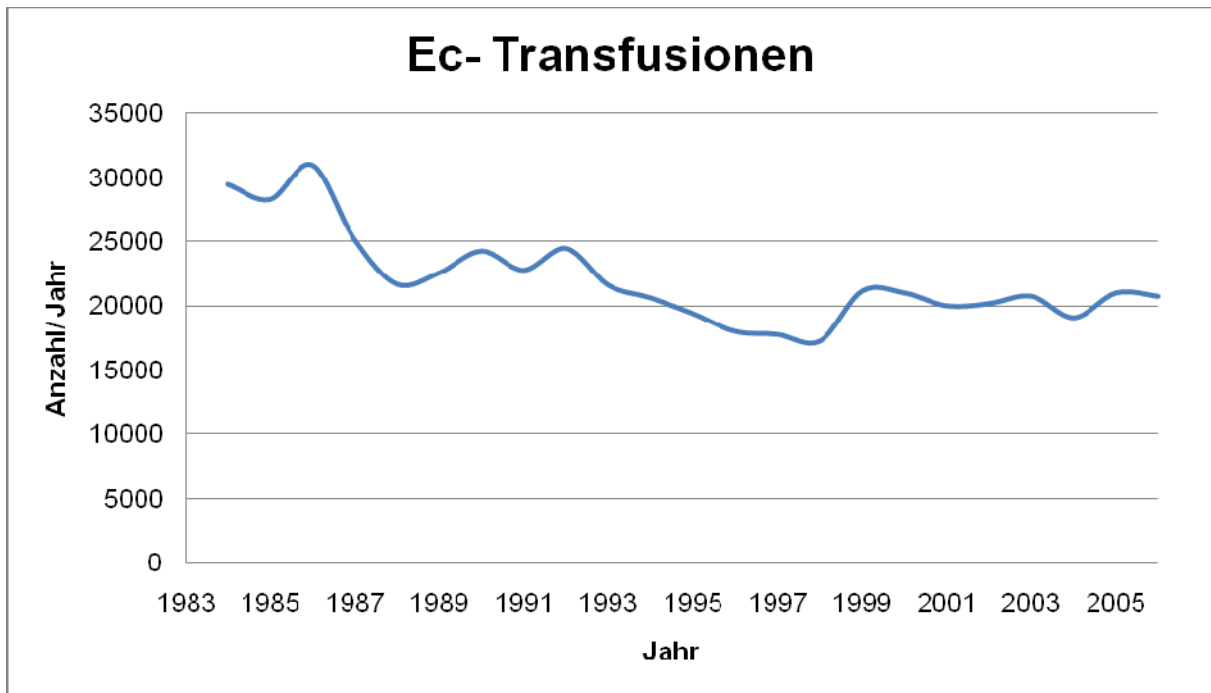


Abbildung 6. Erythrozyten- Transfusionen pro Jahr zwischen 1983-2006. Die Tiefstwerte liegen hier in den Jahren 1996-1998.

3. ABO und Rhesus Blutgruppe

Die Verteilung der ABO Blutgruppen im Patientenkollektiv entspricht der erwarteten Verteilung einer mitteleuropäischen Bevölkerung (s. Abbildung 7).

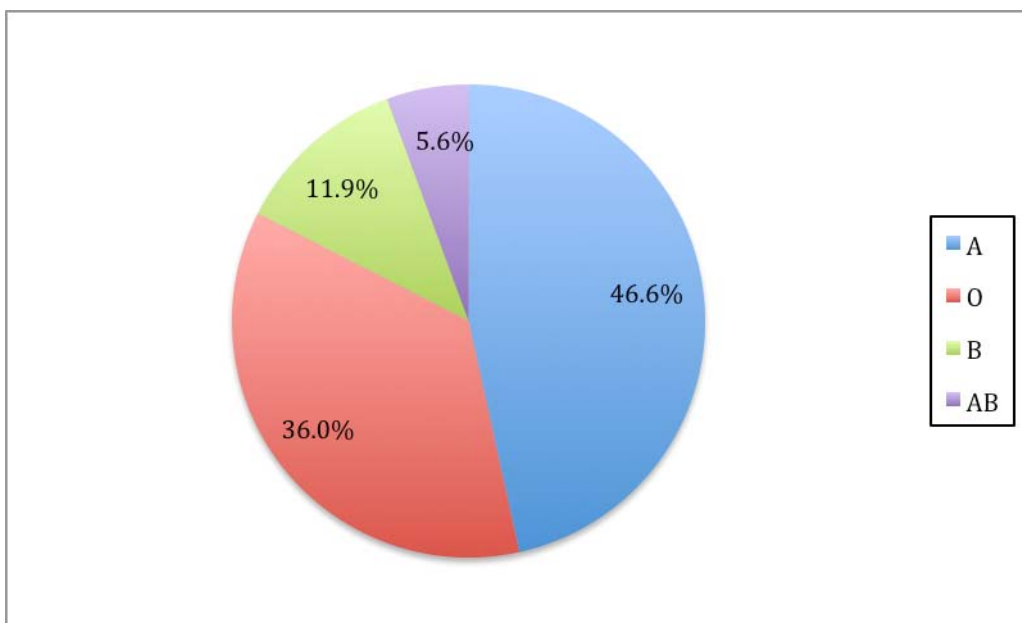


Abbildung 7. Verteilung der ABO Blutgruppen des Patientenkollektivs. Die Häufigkeit der Blutgruppe A liegt bei 47%, O bei 36%, B bei 12% und AB bei 6%.

Bei der Rhesusblutgruppe zeigte sich ein deutliches Überwiegen von Rhesus negativen Proben im Vergleich zur Normalbevölkerung. Die gemessene Häufigkeit von Rhesus negativen Proben betrug 38%, von Rhesus positiven Proben 62% (Abbildung 8). Der Unterschied zur kaukasischen Normalbevölkerung (Rhesus positiv 85%, Rhesus negativ 15% (55)), ist einerseits durch das vermehrte Testen bei Rhesus negativen schwangeren Frauen und andererseits durch die in einem Universitätsspital häufigere Vertretung von anderen Ethnien zu erklären..

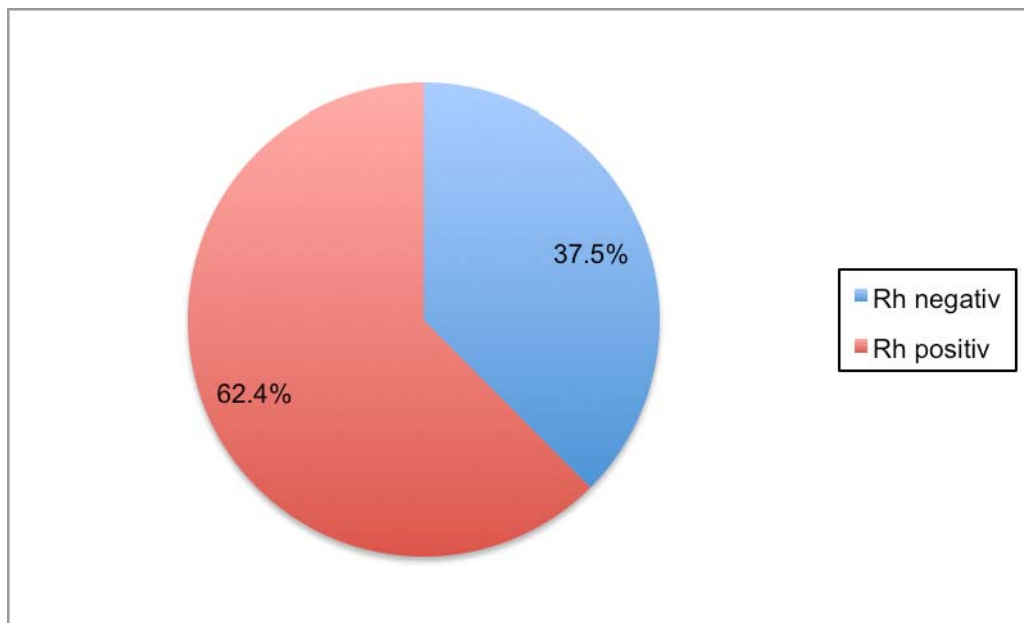


Abbildung 8. *Rhesus Konstellation des Patientenkollektivs. 62.4% waren Rhesus positiv, 37.5% Rhesus negativ.*

Verteilung der positiven Antikörpersuchteste

Insgesamt werden im AKS Antikörper gegen 8 verschiedene Blutgruppensysteme erfasst (Rhesus, Kell, Duffy, Kidd, Lutheran, MNSs, Lewis, P). Da praktisch in allen Blutgruppensystemen Antikörper gegen mehrere Blutgruppen- Antigene gebildet werden können, liegt die Anzahl an erfassten Antikörpern noch höher. Die Antikörper waren am häufigsten gegen das Rhesus System gerichtet (50%), gefolgt von Antikörpern gegen das Lewis- (16%) und Kell System (15%). Die Frequenzen von Antikörpern gegen das Duffy-, Kidd-, Lutheran-, MNS-, und P System lagen jeweils unter 10% (Abbildung 9).

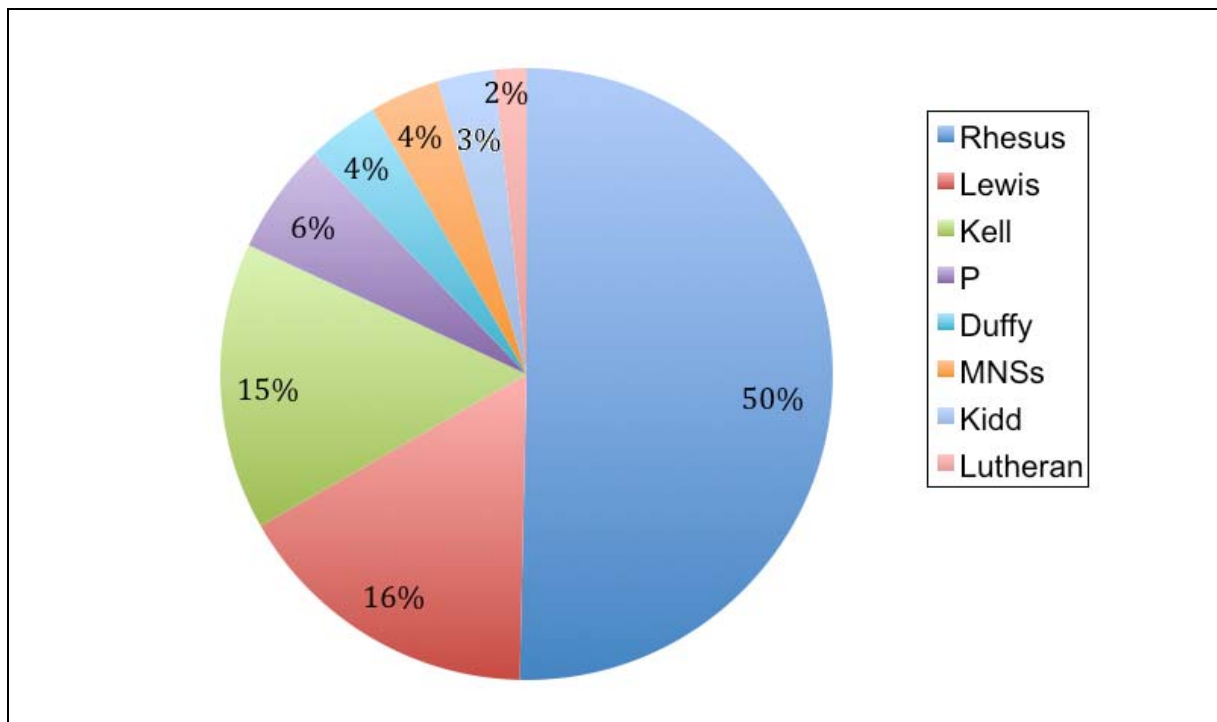


Abbildung 9. Häufigkeit der Antikörper gegen die verschiedenen Blutgruppensysteme.

Die häufigsten vorkommenden Antikörper waren Anti D (24%), Anti E (15%), Anti K (14%) und Anti Le^a (11%). Das Vorkommen aller anderen Antikörper betrug weniger als 10% (siehe Tabelle 3).

Erythrozytäre Antikörper

	Häufigkeit	Prozent
anti-D	1318	23,5
anti-C	313	5,6
anti-E	830	14,8
anti-c	216	3,9
anti-e	39	,7
anti-Cw	106	1,9
anti-K	803	14,3
anti-k	1	,0
anti-Kpa	41	,7
anti-Kpb	6	,1
anti-Jsa	1	,0
anti-Fya	207	3,7
anti-Fyb	8	,1
anti-Jka	142	2,5
anti-Jkb	27	,5
anti-Lea	609	10,9
anti-Leb	306	5,5
anti-P1	323	5,8
anti-M	143	2,6
anti-N	8	,1
anti-S	53	,9
anti-Lua	97	1,7
Total	5597	99,9
Fehlend	5	,1
Total	5602	100,0

Tabelle 3. Häufigkeit der einzelnen Antikörper in Anzahl und Prozent. Die häufigsten vorkommenden Antikörper waren Anti D (24%), Anti E (15%), Anti K (14%), Anti Le^a (11%). Das Vorkommen aller anderen Antikörper betrug weniger als 10%.

Geschlechtsspezifische Unterschiede der positiven AKS

Männer wiesen seltener positive AKS auf als Frauen (28% vs 72%). Dies entspricht einer männlich/weiblich Ratio von 1: 2.6, was mit anderen Studien vergleichbar ist (17, 19, 51, 52). Der Unterschied zugunsten der Frauen erklärt sich hauptsächlich durch häufiger positive Resultate bei Anti D, Anti Fy^a sowie Anti Lu^a, während Anti K und Anti E bei Männern dominierten. Die restlichen Antikörper zeigten keine grossen geschlechtsspezifischen Präferenzen (s. Tabelle 4)

Blutgruppen-system	Antikörper	Männlich *	Weiblich *	P Wert [§]
Rhesus	Anti-D	12.0	38.1	<0.001
	Anti-C	6.2	8.3	0.01
	Anti-E	25.2	17.8	<0.001
	Anti-c	3.9	5.4	0.29
	Anti-e	1.0	0.8	0.413
	Anti-c weak	2.5	2.2	0.537
Kell	Anti-K	20.4	13.7	<0.001
	Anti-k	0.1	0	0.109
	Anti-Kp ^a	1.1	0.9	0.335
	Anti-Kp ^b	0.1	0.1	0.773
	Anti-Js ^a	0	0	0.377
	Anti-Js ^b	Keine positiven Resultate		
Duffy	Anti-Fy ^a	7.0	3.1	<0.001
	Anti-Fy ^b	0.1	0.2	0.466
Kidd	Anti-Jk ^a	3.8	2.3	0.003
	Anti-Jk ^b	0.5	0.5	0.866
Lewis	Anti-Le ^a	13.6	12.2	0.179
	Anti-Le ^b	5.5	5.5	0.931
P	Anti-P ¹	8.0	5.1	<0.001
MNS	Anti-M	3.0	2.5	0.258
	Anti-N	0.3	0.1	0.481
	Anti-S	1.4	0.8	0.037
	Anti-s	0.2	0.1	0.724
Lutheran	Anti-Lu ^a	3.3	1.1	<0.001
	Anti-Lu ^b	Keine positiven Resultate		
* Prozent, [§] χ^2 oder Fisher' exact test				

Tabelle 4. Geschlechtsspezifische Verteilung der Antikörper. Anti D, Anti- Fy^a sowie Anti Lu^a traten signifikant häufiger bei Frauen auf, während Anti K und Anti E bei Männern dominierten. Die restlichen Antikörper zeigten keine grossen geschlechtsspezifischen Präferenzen.

Zeitlicher Verlauf der positiven AKS

Seit Beginn der AKS Bestimmung zeigte sich ein mehr oder weniger kontinuierlicher Anstieg der Anzahl an positiven AKS bis und mit 1990. Ab 1991 kommt es zu einem steileren Anstieg, bedingt durch eine parallel verlaufende Zunahme der Rhesus-Antikörper (Abbildung 10). Der Peak wird 1994 erreicht. Danach fallen die Rhesusantikörper wieder etwas ab, bleiben aber abgesehen von 1996 im Vergleich zum Beginn der Messung auf einem deutlich höheren Niveau bevor sie 1999 steil abfallen. Ab dem Jahr 1999, in welchem die Einführung der Leukozytendepletion erfolgte, lässt sich ein beträchtlicher Abfall der positiven AKS/ totalen AKS pro Jahr beobachten (Abbildung 10). Der Abfall ist hauptsächlich bedingt durch eine

Reduktion der häufigen Antikörper (Rhesus, Kell, Lewis), während sich die anderen Antikörper über die Zeit praktisch unverändert präsentierten.

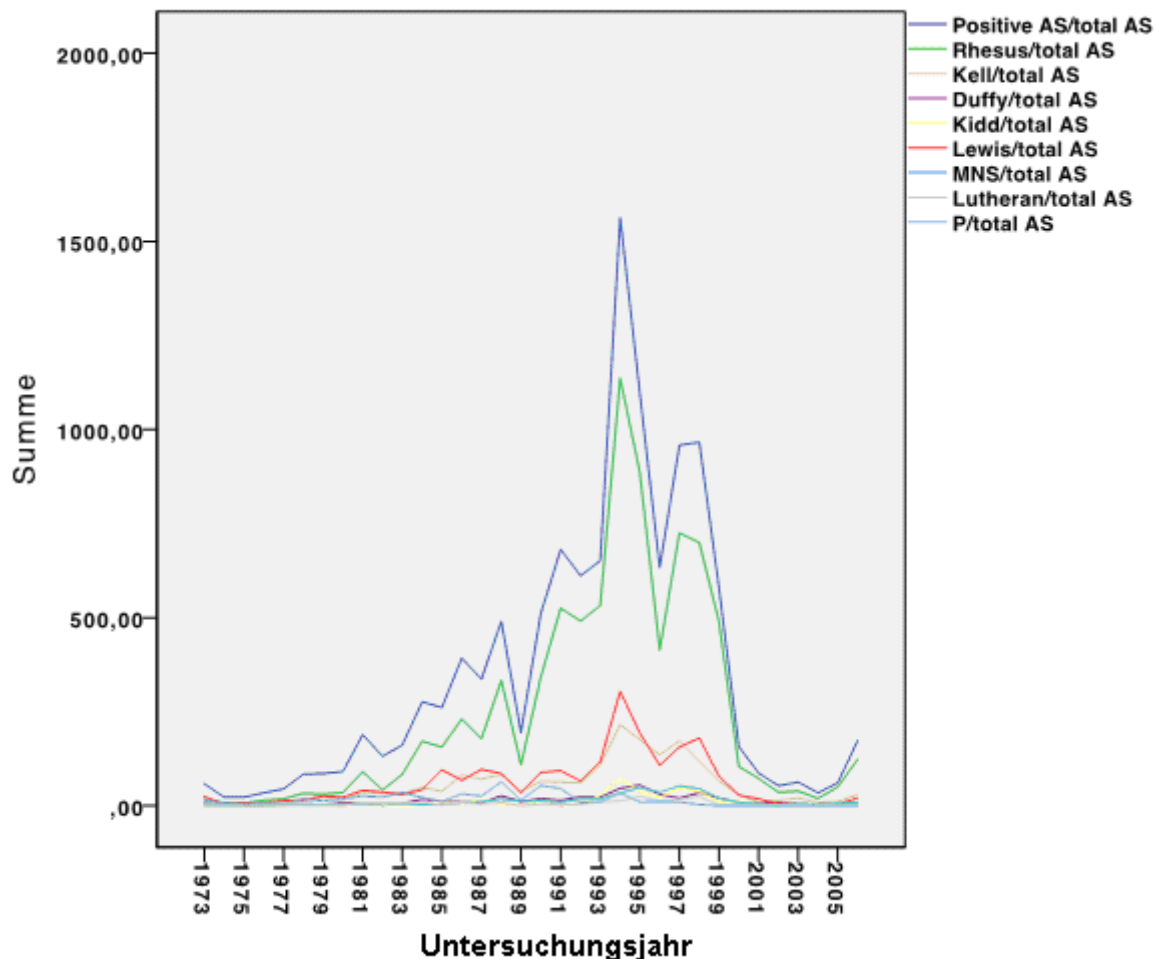


Abbildung 10. Positive AKS im Verhältnis zur totalen Anzahl durchgeführter AKS pro Jahr. Im Jahre 1999 zeigt sich ein beträchtlicher Abfall hauptsächlich bedingt durch die Reduktion von Antikörpern gegen Rhesus, Kell und Lewis.

Beim genaueren Betrachten fällt auf, dass der Abfall im Rhesus System vor allem Anti D und Anti E betrifft (s. Abbildung 11). Interessanterweise scheint der Abfall von Anti D hauptsächlich bei Frauen eine Rolle zu spielen. Bei den Männern fällt vor allem der Abfall von Anti E ins Gewicht (s. Abbildung 12). Im Lewis System ist vor allem Anti Le^a (s. Abbildung 14), im Kell System hauptsächlich Anti K betroffen, wobei der Abfall dort aus unklaren Gründen bereits vor 1999 beginnt (s. Abbildung 13). Betrachtet man in diesem speziellen Fall jedoch das jeweilige Verhältnis positive AKS auf Anti K/ positive AKS total in den Jahren 1997-2001, so lässt sich ein deutlicher Abfall des Verhältnisses nach 1999 erkennen (s. Tabelle 5).

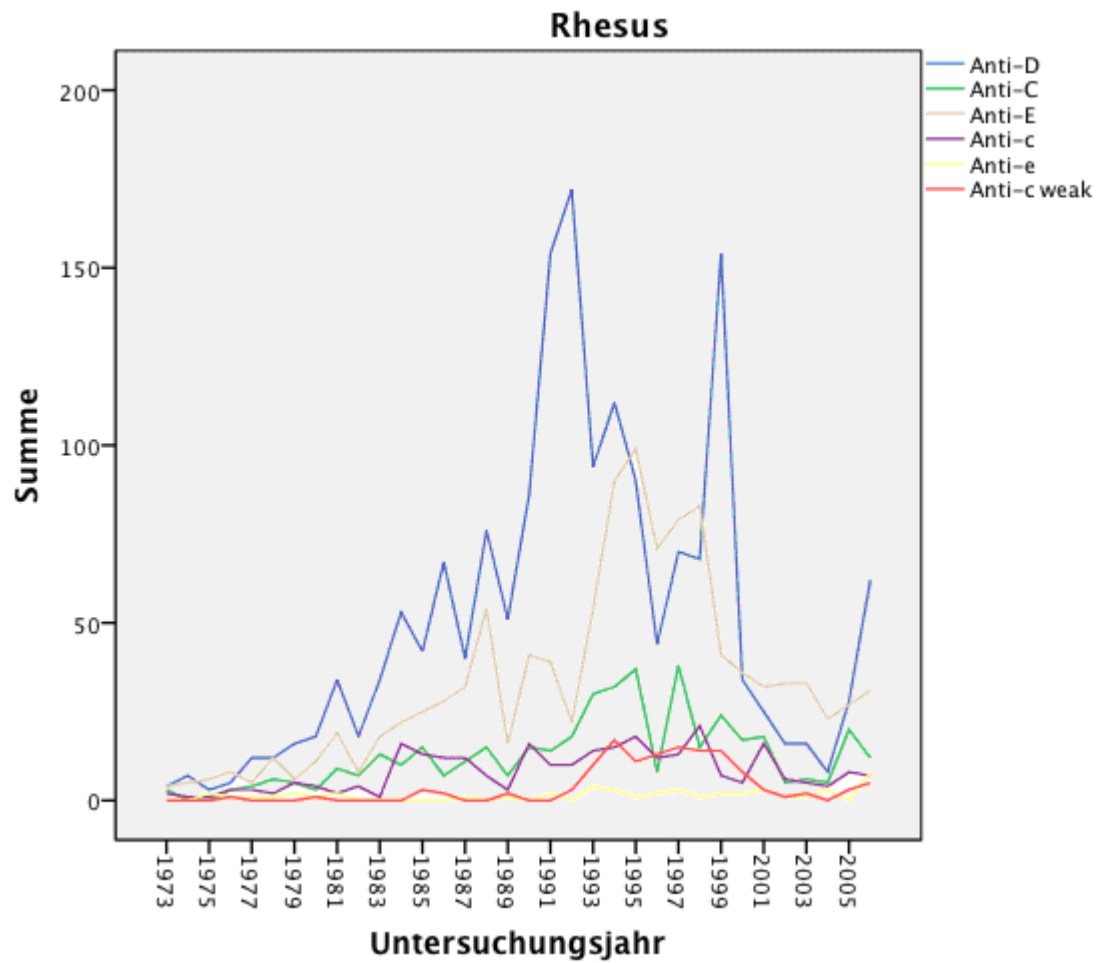


Abbildung 11. Verlauf der Häufigkeit der einzelnen Antikörper im Rhesus System.
Der Abfall im Jahr 1999 betrifft hauptsächlich Anti D und Anti E.

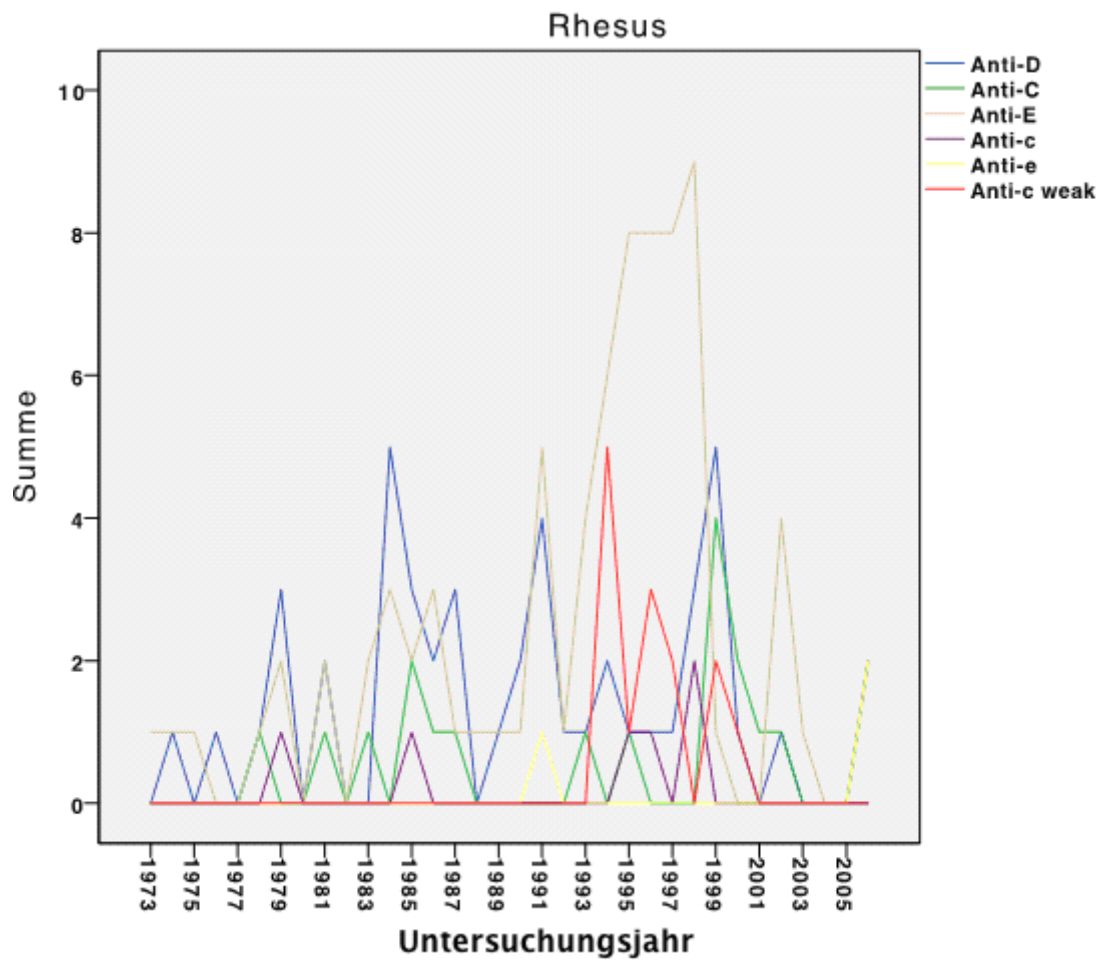


Abbildung 12. Verlauf der Häufigkeit der einzelnen Antikörper im Rhesus System bei Männern. Hier fällt hauptsächlich der Abfall von Anti E im Jahr 1999 ins Gewicht.

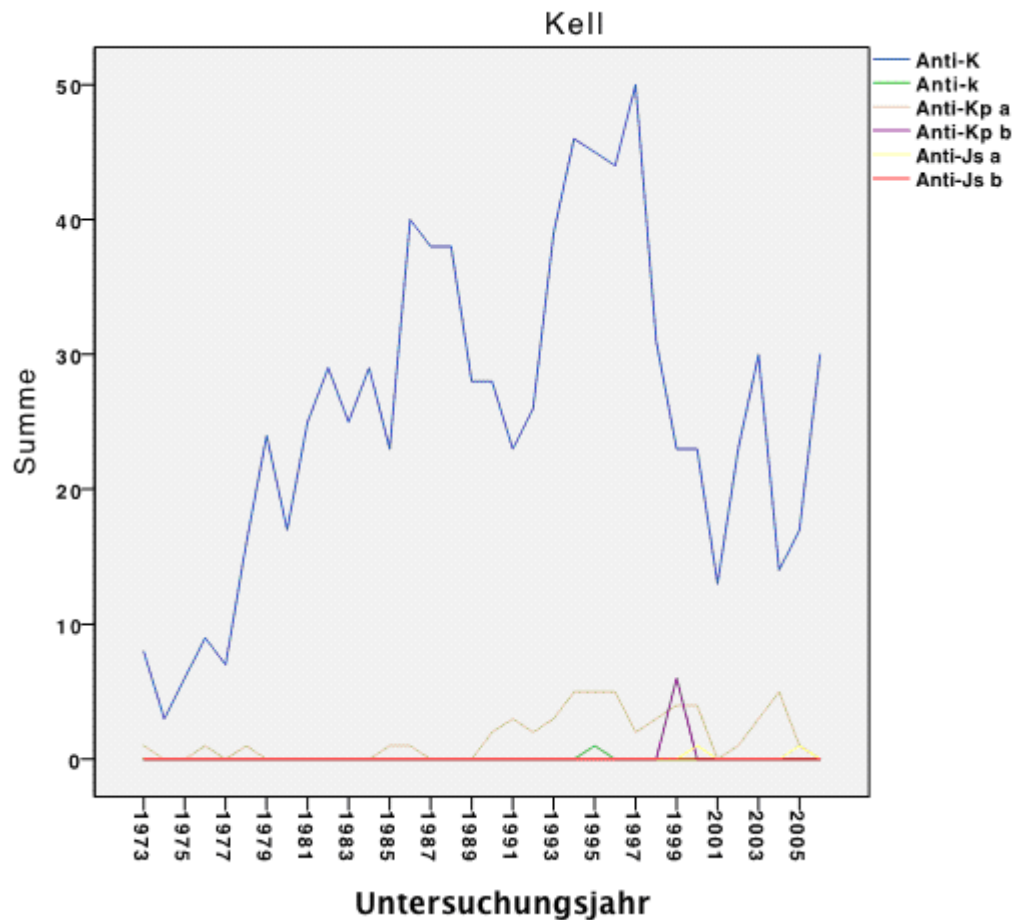


Abbildung 13. Verlauf der Häufigkeit der einzelnen Antikörper im Kell System. Es fällt hauptsächlich Anti K ab, der Abfall beginnt jedoch bereits im Jahr 1998.

Jahr	Pos. AKS auf Anti K/ pos. AKS total
1997	0.0057
1998	0.0038
1999	0.0016
2001	0.0008

Tabelle 5. Verhältnisse pos. AKS auf Anti K/ pos. AKS total in den Jahren 1997 bis 2001. Nach Einführung der Leukozytendepletion im Jahr 1999 lässt sich ein markanter Abfall des Verhältnisses beobachten.

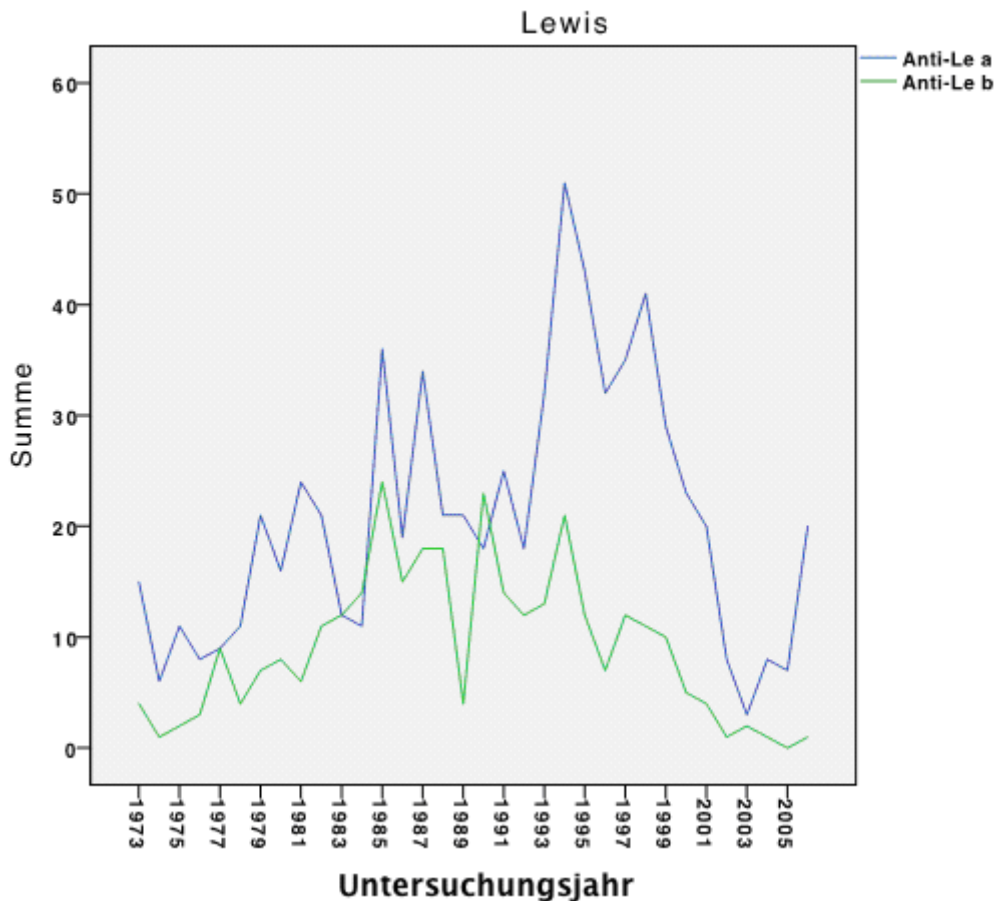


Abbildung 14. Verlauf der Häufigkeit der einzelnen Antikörper im Lewis System. Im Jahre 1999 fällt hauptsächlich Anti Le^a ab.

Der sinkende Trend ab dem Jahre 1999 zeigt sich bis ins Jahr 2004, wo ein Tiefstwert von 0.45% erreicht wird, bevor der Wert wieder ansteigt bis auf 0.98% im Jahre 2006. Insgesamt lag die Ratio positive AKS/ totale AKS in den Jahren vor Leukozytendepletion bei 0.02, in den Jahren danach bei 0.01 (s.Tabelle 6)

	Studienperiode	
	1973-1998	1999-2006
Ratio positive AKS/ AKS Total	0.02	0.01

Tabelle 6. Ratio positive AKS/ AKS Total vor und nach Einführung der Leukozytendepletion.

5. Diskussion

In dieser 34 Jahre umfassenden retrospektiven Studie wurde die Prävalenz von klinisch signifikanten Antikörpern gegen Rhesus-, Kell-, Duffy Kidd-, Lewis-, Lutheran-, und MNSs Antigene vor und nach Einführung der Leukozytendepletion im Jahr 1999 am UniversitätsSpital Zürich untersucht. In den Jahren 1973 bis und mit 2006 wurden insgesamt 378'785 Antikörpersuchtests (AKS) durchgeführt, davon fielen 5602 (1.4%) positiv aus. Diese Zahl entspricht der in verschiedenen Studien publizierten Prävalenz von 1-2% bei stationären Patienten (17, 51, 52, 53). Andere Studien weichen von diesen Zahlen ab. So ermittelte eine retrospektive Studie zwischen den Jahren 1985 bis 1993, also vor Einführung der Leukozytendepletion, bei einem Total von 159'262 Patienten eine Prävalenz von 2.9% (11). Eine weitere Studie, welche die Prävalenz antierythrozytärer Antikörper bei männlichen Militärveteranen untersuchte, fand bei 2.4% der AKS ein positives Resultat (18). Rund 70% der Veteranen waren während dem zweiten Weltkrieg, dem koreanischen Krieg, dem Vientnamkrieg und dem Golfkrieg als Soldaten tätig und einige von ihnen waren in dieser Zeit kriegsbedingt transfusionsbefähigt, also deutlich vor Einführung der Leukozytendepletion. Die Studie lässt sich aber nur bedingt mit unseren Daten vergleichen, da hauptsächlich (gesunde) Männer untersucht wurden.

Nachdem in den Jahren ab 1991 eine deutliche Steigerung der positiven Antikörpersuchtests, wahrscheinlich bedingt durch die Zusammenlegung des Labors der Frauenklinik mit dem Hauptlabor sowie dem immer mehr verwendeten sensitiveren ID Test, zu verzeichnen war, trat eindrucklich ein deutlicher Abfall von positiven AKS im Verhältnis zur Gesamtzahl der durchgeführten Tests im Jahr 1999 im Vergleich zu 1998 (s. Abbildung 10) auf. Im Jahr 1999 erfolgte die Einführung der generellen Leukozytendepletion in der Schweiz. Vergleicht man die Zeit vor und nach Einführung der Leukozytendepletion am UniversitätsSpital Zürich, so erhält man über die Jahre 1973 bis und mit 1998 eine Ratio (positive AKS/Totale AKS) von 0.02 während der Wert in den Jahren 1999 bis 2006 0.01, also halb so viel beträgt. Entsprechend beträgt die Alloantikörperprävalenz in den Jahren 1973- 1998 rund 2% und in den Jahren 1999-2006 rund 1%. Diese Beobachtung ist insofern interessant, als dass bis heute umstritten ist, ob mittels Transfusion von leukozytendepletiertem Blut eine Reduktion der Inzidenz von antierythrozytären Antikörpern erzielt werden kann. Spielen nun Spenderleukozyten eine Hauptrolle in der Entstehung von Alloantikörpern, so würde man durch Entfernung dieser Leukozyten, wie am Beispiel

der HLA Alloimmunisierung im Rahmen von Thrombozytentransfusionen bereits gezeigt worden ist, auch eine verminderte Rate an antierythrozytären Antikörpern erwarten. Diese Hypothese konnte bisher jedoch nur teilweise bestätigt werden. Eine retrospektive Kohortenstudie mit 410 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und 217 Patienten, welche aus verschiedenen Gründen Transfusionen erhalten hatten, konnte eine verminderte Inzidenz antierythrozytärer Antikörper mit Zunahme des Gebrauchs an leukozytendepletiertem Blut nachweisen. Dieser Effekt war aber nur in der Gruppe der AML Patienten, welche Blut oder Thrombozyten mit bzw. ohne Leukozytenfiltration erhielten, signifikant, nämlich 2.8 versus 8.1% ($p=0.016$). In der randomisierten Patientengruppe war die Rate der Alloimmunisierung gegenüber Rhesus, Duffy, Kell und Kidd nicht-signifikant vermindert (56). In einer anderen Studie, welche die Gabe von leukozytendepletierten gelagerten Erythrozyten mit frischen, nicht leukozytenreduzierten Erythrozyten an Frühgeborenen verglich, konnte bezüglich Alloimmunisierung kein Vorteil der Leukozytendepletion gezeigt werden. Die Autoren weisen aber darauf hin, dass die Inzidenz von Allo-Antikörpern bei Frühgeborenen allgemein sehr gering ist und dass in diesem Kontext deshalb keine generelle Leukozytendepletion gerechtfertigt ist (57). Eine weitere Studie von 2003 konnte keine Reduktion der anti- erythrozytären Alloimmunisierung durch Leukozytendepletion in einer randomisierten Patientengruppe, bestehend aus 374 herzchirurgischen Patienten, nachweisen (58). Singer et al. untersuchte die Inzidenz antierythrozytärer Antikörper in 64 mehrfach transfundierten Thalassämie-Patienten und fand eine nicht signifikante Verminderung der antierythrozytären Alloimmunisierung mit einem fraglich parallelen Verlauf zur Einführung der Leukozytendepletion. Es schien aber wahrscheinlicher, dass eine Änderung der Transfusionsrichtlinien, welche ein präventives Rhesus- und Kell- Matching vor Transfusionen vorschrieb, zur verminderten Immunisierung beitrug (59). Gemäss einer regionalen multizentrischen retrospektiven Studie von Schonewille et al 2005, wurde zwischen der Buffy-coat-Leukozytenreduktion und der Leukozytenfiltration kein Unterschied in der Entwicklung klinisch signifikanter antierythrozytärer Alloimmunisierung festgestellt (22). Analysiert man unsere Daten, so zeichnet sich ein anderes Bild ab. Während die Anzahl positiver AKS im Jahre 1998 einen Anteil von 3.4% verbucht, beträgt dieser im Jahre 2000 1%. Das Jahr 1999 liegt mit 2% dazwischen. Die Anzahl positiver AKS ist also trotz einem Abfall im Vergleich zum Vorjahr ca. doppelt so hoch wie in 2000. Da die Leukozytendepletion jedoch nicht am

1. Januar sondern erst am 1. Juli 1999 eingeführt und die 6 Monate davor noch mit der Entfernung des Buffy Coats gearbeitet wurde, könnte dies der Grund sein, weshalb der Abfall im Jahre 1999 im Vergleich zu 1998 nicht gleich stark ausfiel, sondern nur etwa halb so stark. Diese Daten unterstützen somit die Hypothese, dass die Entfernung von Leukozyten aus dem Spenderblut mittels Filtration eine nicht zu unterschätzende Rolle im verminderten Auftreten von antierythrozytärer Alloimmunisierung spielt. Verantwortlich für den Abfall der Gesamtzahl an positiven AKS ab 1999 ist die Reduktion der Anti- Rhesus-, Anti- Kell-, Anti- Lewis- Antikörper, während die anderen Antikörper über die Jahre konstant bleiben. Bei Ersteren handelt es sich interessanterweise um die am häufigsten vorkommende Antikörper (17, 18). Diese Antikörper scheinen also am sensitivsten auf die Leukozytendepletion zu reagieren, oder aber die Unterschiede sind aufgrund ihrer höheren Inzidenz besser sichtbar. Gerade die Reduktion von Rhesus- und Kell- Antikörpern ist bedeutungsvoll, da es sich hier nicht nur um die häufigsten, sondern bezüglich unerwünschter Transfusionsreaktionen auch um sehr potente Antikörper handelt. Während einige Vorteile der Leukozytendepletion, wie beispielsweise Verminderung der HLA Alloimmunisierung oder Reduktion von febrilen, nicht hämolytischen Transfusionsreaktionen (NHFTRs) als gesichert gelten, ist man sich bezüglich der Frage, ob Leukozytendepletion zu einem signifikanten Rückgang der anti-erythrozytären Antikörper führt, unschlüssig. Unsere Daten sind ein starker Hinweis darauf, dass die Leukozytendepletion die Alloimmunisierung gegen die häufigen Blutgruppensysteme Rhesus, Kell und Lewis vermindert.

6. Schlussfolgerung

In der vorliegenden retrospektiven Studie konnte im untersuchten Patientenkollektiv am UniversitätsSpital Zürich ein deutlicher Abfall antierythrozytärer Antikörper, insbesondere von Anti D, Anti K und Anti Le^a, nach Einführung der Leukozytendepletion im Jahre 1999 beobachtet werden. Damit wird die Hypothese unterstützt, dass die nachgewiesene immunmodulatorische Wirkung von Leukozyten im Spenderblut auch für die Entstehung von antierythrozytären Antikörpern von Bedeutung ist. Die Leukozytendepletion führt möglicherweise zu einer Verminderung der Inzidenz von antierythrozytären Antikörpern in einer unselektionierten Population von Spitalpatienten. Dieser Befund ist einerseits interessant, weil diese Hypothese bis heute sehr umstritten ist, andererseits, weil die Verminderung antierythrozytärer Antikörper einen überaus wünschenswerten Effekt darstellen würde, da antierythrozytäre Alloimmunisierung posttransfusionell zu gefährlichen Nebenwirkungen führen kann.

7. Referenzen

- (1) www.haematologie.unispital.ch/Documents/UeberUns/Jahresbericht/HAE_ZahlenFakten_06.pdf
- (2) <http://ibgri.blood.co.uk/isbt%20pages/ISBT%20Terminology%20Pages/Terminology%20Home%20Page.htm>
- (3) Pollack W, Ascari WQ, Crispen JF, O'Connor RR, Ho TY. Studies on Rh prophylaxis. II. Rh immune prophylaxis after transfusion with Rh-positive blood. *Transfusion*. 1971 Nov-Dec;11(6):340-4.
- (4) Cook K, Rush B. Rh(D) immunization after massive transfusion of Rh(D)-positive blood. *Med J Aust*. 1974 Feb 9;1(6):166-8.
- (5) Urbaniak SJ, Robertson AE. A successful program of immunizing Rh-negative male volunteers for anti-D production using frozen/thawed blood. *Transfusion*. 1981 Jan-Feb;21(1):64-9.
- (6) Schonewille H, Brand A. Does an alloimmune response to strong immunogenic red blood cell antigens enhance a response to weaker antigens? *Transfusion*. 2008 May;48(5):958-63.
- (7) Bauer MP, Wiersum-Osselton J, Schipperus M, Vandenbroucke JP, Briët E. Clinical predictors of alloimmunization after red blood cell transfusion. *Transfusion*. 2007 Nov;47(11):2066-71.
- (8) Hendrickson JE, Desmarests M, Deshpande SS, Chadwick TE, Hillyer CD, Roback JD, Zimring JC. Recipient inflammation affects the frequency and magnitude of immunization to transfused red blood cells. *Transfusion*. 2006 Sep;46(9):1526-36.

- (9) Zimring JC, Hendrickson JE. The role of inflammation in alloimmunization to antigens on transfused red blood cells. *Curr Opin Hematol*. 2008 Nov;15(6):631-5.
- (10) Schonewille H, van de Watering LM, Brand A. Additional red blood cellalloantibodies after blood transfusions in a nonhematologic alloimmunized patientcohort: is it time to take precautionary measures? *Transfusion*. 2006 Apr;46(4):630-5.
- (11) Hoeltge GA, Domen RE, Rybicki LA, Schaffer PA. Multiple red cell transfusions and alloimmunization. Experience with 6996 antibodies detected in a total of 159,262 patients from 1985 to 1993. *Arch Pathol Lab Med*. 1995 Jan;119(1):42-5.
- (12) Heddle NM, Soutar RL, O'Hoski PL, Singer J, McBride JA, Ali MA, Kelton JG. A prospective study to determine the frequency and clinical significance of alloimmunization post-transfusion. *Br J Haematol*. 1995 Dec;91(4):1000-5.
- (13) Fluit CR, Kunst VA, Drenthe-Schonk AM. Incidence of red cell antibodies after multiple blood transfusion. *Transfusion*. 1990 Jul-Aug;30(6):532-5.
- (14) Schonewille H, Haak HL, van Zijl AM. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion*. 1999 Jul;39(7):763-71.
- (15) Brantley SG, Ramsey G. Red cell alloimmunization in multitransfused HLA-typed patients. *Transfusion*. 1988 Sep-Oct;28(5):463-6.
- (16) Redman M, Regan F, Contreras M. A prospective study of the incidence of red cell allo-immunisation following transfusion. *Vox Sang*. 1996;71(4):216-20.

- (17) Winters JL, Pineda AA, Gorden LD, Bryant SC, Melton LJ 3rd, Vamvakas EC, Moore SB. RBC alloantibody specificity and antigen potency in Olmsted County, Minnesota. *Transfusion*. 2001 Nov;41(11):1413-20.
- (18) Tormey CA, Fisk J, Stack G. Red blood cell alloantibody frequency, specificity, and properties in a population of male military veterans. *Transfusion*. 2008 Oct;48(10):2069-76.
- (19) Schonewille H, van de Watering LM, Loomans DS, Brand A. Red blood cell alloantibodies after transfusion: factors influencing incidence and specificity. *Transfusion*. 2006 Feb;46(2):250-6.
- (20) Schonewille H, Haak HL, van Zijl AM. RBC antibody persistence. *Transfusion*. 2000 Sep;40(9):1127-31.
- (21) Bruil A, Beugeling T, Feijen J, van Aken WG. The mechanisms of leukocyte removal by filtration. *Transfus Med Rev* 1995;9:45-66
- (22) Schonewille H, Brand A. Alloimmunization to red blood cell antigens after universal leucodepletion. A regional multicentre retrospective study. *Br J Haematol*. 2005 Apr; 129(1):151-6.
- (23) Yomtovian R, Gernsheimer T, Assmann SF, Mohandas K, Lee TH, Kalish LA, Busch MP; Viral Activation Transfusion Study Group. WBC reduction in RBC concentrates by prestorage filtration: multicenter experience. *Transfusion*. 2001 Aug;41(8):1030-6.
- (24) Mintz PD, ed. *Transfusion therapy: Clinical principles and practice*. 2nd ed. Bethesda, MD: AABB Press, 2005:279-96.
- (25) Vamvakas EC. Meta-analysis of randomized controlled trials of the efficacy of white cell reduction in preventing HLA-alloimmunization and refractoriness to random-donor platelet transfusions. *Transfus Med Rev*. 1998 Oct;12(4):258-70.

- (26) Kirkley SA, Cowles J, Pellegrini VD, Harris CM, Boyd AD, Blumberg N. Blood transfusion and total joint replacement surgery: T helper 2 (TH2) cytokine secretion and clinical outcome. *Transfus Med*. 1998 Sep;8(3):195-204.
- (27) Babcock GF, Alexander JW. The effects of blood transfusion on cytokine production by TH1 and TH2 lymphocytes in the mouse. *Transplantation*. 1996 Feb 15;61(3):465-8.
- (28) Blumberg N, Heal JM. The transfusion immunomodulation theory: the Th1/Th2 paradigm and an analogy with pregnancy as a unifying mechanism. *Semin Hematol*. 1996 Oct;33(4):329-40.
- (29) Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. *N Engl J Med*. 1997 Dec 25;337(26):1861-9.
- (30) Seftel MD, Growe GH, Petraszko T, Benny WB, Le A, Lee CY, Spinelli JJ, Sutherland HJ, Tsang P, Hogge DE. Universal prestorage leukoreduction in Canada decreases platelet alloimmunization and refractoriness. *Blood*. 2004 Jan 1;103(1):333-9.
- (31) Claas FH, Smeenk RJ, Schmidt R, van Steenbrugge GJ, Eernisse JG. Alloimmunization against the MHC antigens after platelet transfusions is due to contaminating leukocytes in the platelet suspension. *Exp Hematol*. 1981 Jan;9(1):84-9.
- (32) Howard JE, Perkins HA. The natural history of alloimmunization to platelets. *Transfusion*. 1978 Jul-Aug;18(4):496-503.

- (33) Dzieczkowski JS, Barrett BB, Nester D, Campbell M, Cook J, Sugrue M, Andersen JW, Anderson KC. Characterization of reactions after exclusive transfusion of white cell-reduced cellular blood components. *Transfusion*. 1995 Jan;35(1):20-5.
- (34) Pruss A, Kalus U, Radtke H, Koscielny J, Baumann-Baretti B, Balzer D, Dörner T, Salama A, Kieseewetter H. Universal leukodepletion of blood components results in a significant reduction of febrile non-hemolytic but not allergic transfusion reactions. *Transfus Apher Sci*. 2004 Feb;30(1):41-6.
- (35) King KE, Shirey RS, Thoman SK, Bensen-Kennedy D, Tanz WS, Ness PM. Universal leukoreduction decreases the incidence of febrile nonhemolytic transfusion reactions to RBCs. *Transfusion*. 2004 Jan;44(1):25-9.
- (36) Paglino JC, Pomper GJ, Fisch GS, Champion MH, Snyder EL. Reduction of febrile but not allergic reactions to RBCs and platelets after conversion to universal prestorage leukoreduction. *Transfusion*. 2004 Jan;44(1):16-24.
- (37) Mark E. Beecher. Technical Manual, 14th edition. Bethesda, Md. : American Association of Blood Banks, 2002.
- (38) Narvios AB, de Lima M, Shah H, Lichtiger B. Transfusion of leukoreduced cellular blood components from cytomegalovirus-unscreened donors in allogeneic hematopoietic transplant recipients: analysis of 72 recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Sep;36(6):499-501.
- (39) Visconti MR, Pennington J, Garner SF, Allain JP, Williamson LM. Assessment of removal of human cytomegalovirus from blood components by leukocyte depletion filters using real-time quantitative PCR. *Blood*. 2004 Feb 1;103(3):1137-9.

- (40) Bowden RA, Slichter SJ, Sayers M, Weisdorf D, Cays M, Schoch G, Banaji M, Haake R, Welk K, Fisher L, McCullough J, Miller W. A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV infection after marrow transplant. *Blood*. 1995 Nov 1;86(9):3598-603.
- (41) Vamvakas EC, Moore SB. Blood transfusion and postoperative septic complications. *Transfusion*. 1994 Aug;34(8):714-27.
- (42) Murphy P, Heal JM, Blumberg N. Infection or suspected infection after hip replacement surgery with autologous or homologous blood transfusions. *Transfusion*. 1991 Mar-Apr;31(3):212-7.
- (43) Jensen LS, Andersen AJ, Christiansen PM, Hokland P, Juhl CO, Madsen G, Mortensen J, Møller-Nielsen C, Hanberg-Sørensen F, Hokland M. Postoperative infection and natural killer cell function following blood transfusion in patients undergoing elective colorectal surgery. *Br J Surg*. 1992 Jun;79(6):513-6.
- (44) Jensen LS, Kissmeyer-Nielsen P, Wolff B, Qvist N. Randomised comparison of leucocyte-depleted versus buffy-coat-poor blood transfusion and complications after colorectal surgery. *Lancet*. 1996 Sep 28;348(9031):841-5.
- (45) Ottonello L, Ghio M, Contini P, Bertolotto M, Bianchi G, Montecucco F, Colonna M, Mazzei C, Dallegri F, Indiveri F. Nonleukoreduced red blood cell transfusion induces a sustained inhibition of neutrophil chemotaxis by stimulating in vivo production of transforming growth factor-beta1 by neutrophils: role of the immunoglobulinlike transcript 1, sFasL, and sHLA-I. *Transfusion*. 2007 Aug;47(8):1395-404.

- (46) Llewelyn CA, Taylor RS, Todd AA, Stevens W, Murphy MF, Williamson LM; Leucodepletion Study Group. The effect of universal leukoreduction on postoperative infections and length of hospital stay in elective orthopedic and cardiac surgery. *Transfusion*. 2004 Apr;44(4):489-500.
- (47) Buchholz DH, AuBuchon JP, Snyder EL, Kandler R, Piscitelli V, Pickard C, Napychank P, Edberg S. Effects of white cell reduction on the resistance of blood components to bacterial multiplication. *Transfusion*. 1994 Oct;34(10):852-7.
- (48) Holden F, Foley M, Devin G, Kinsella A, Murphy WG. Coagulase-negative staphylococcal contamination of whole blood and its components: the effects of WBC reduction. *Transfusion*. 2000 Dec;40(12):1508-13
- (49) Christian Mueller-Eckhardt, Volker Kiefel. *Transfusionsmedizin*. 3. Auflage. Springer Verlag, 2003.
- (50) Gerber B, Schanz U, Stüssi G. [Autoimmune hemolytic anemia]. *Ther Umsch*. 2010 May;67(5):229-36. Review. German.
- (51) Walker RH, Lin DT, Hartrick MB. Alloimmunization following blood transfusion. *Arch Pathol Lab Med*. 1989 Mar;113(3):254-61.
- (52) Spielmann W, Seidl S. Prevalence of irregular red cell antibodies and their significance in blood transfusion and antenatal care. *Vox Sang*. 1974;26(6):551-9.
- (53) Giblett ER. Blood group alloantibodies: an assessment of some laboratory practices. *Transfusion*. 1977 Jul-Aug;17(4):299-308.
- (54) Weinberg PD, Hounshell J, Sherman LA, Godwin J, Ali S, Tomori C, Bennett CL. Legal, financial, and public health consequences of HIV contamination of blood and blood products in the 1980s and 1990s. *Ann Intern Med*. 2002 Feb 19;136(4):312-9.

- (55) Race RR, Sanger R: Blood group in man. 6th ed, Blackwell Oxford, p.323, 1975.
- (56) Blumberg N, Heal JM, Gettings KF. WBC reduction of RBC transfusions is associated with a decreased incidence of RBC alloimmunization. Transfusion. 2003 Jul;43(7):945-52
- (57) Strauss RG, Cordle DG, Quijana J, Goeken NE. Comparing alloimmunization in preterm infants after transfusion of fresh unmodified versus stored leukocyte-reduced red blood cells. J Pediatr Hematol Oncol. 1999 1. May-Jun;21(3):224-30.
- (58) van de Watering L, Hermans J, Witvliet M, Versteegh M, Brand A. HLA and RBC immunization after filtered and buffy coat-depleted blood transfusion in cardiac surgery: a randomized controlled trial. Transfusion. 2003 Jun;43(6):765-71.
- (59) Singer ST, Wu V, Mignacca R, Kuypers FA, Morel P, Vichinsky EP. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly asian descent. Blood. 2000 Nov 15;96(10):3369-73.

8. Verdankung

Ich möchte allen, die mir die Arbeit an meiner Dissertation ermöglichten und erleichterten, ganz herzlich danken:

- PD Dr. med. Urs Schanz und PD Dr. med. Georg Stüssi, Klinik für Hämatologie, welche mich bei der Dissertation tatkräftig unterstützen, und ohne welche die Arbeit nie zustande gekommen wäre
- Dr. med. Kornelius Arn, Oberarzt Klinik für Hämatologie, welcher mich mit einigen wichtigen Inputs unterstützte
- Den Mitarbeiterinnen der Blutbank des UniversitätsSpitals Zürich
- David Goslings und Asa Valek vom Zürcher Blutspendedienst für die Vermittlung einiger wichtiger Informationen zur Methodik

Speziell danken möchte ich PD Dr. med. Georg Stüssi für die grosse Hilfe bei der Statistik.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie, meinen Geschwistern und Richo Valek für die moralische Unterstützung während dieser Arbeit. Ihnen soll sie gewidmet sein.

9. Curriculum vitae

Ruth Andrea Köppel von Zürich

17. April 1985	Geboren in Zürich
1991-1997	Primarschule Schöfflisdorf
1997-1999	Sekundarschule Niederweningen
1999-2003	Gymnasium Unterstrasse, Zürich (Matura Typus M)
2004- 2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Zürich
September 2010	Staatsexamen, Universität Zürich
Seit Oktober 2010	Assistenzärztin Chirurgie, Spital Affoltern am Albis